

Isolamento, caracterização morfológica e avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura de cepas do fungo *Quambalaria* sp.

Ediellen Mayara Corrêa Gomes^{1*} e Rosângela da Conceição Marques Pena²

1. Engenheira Florestal (Universidade do Estado do Amapá). Mestre em Produção Vegetal (Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil).

2. Engenheira Agrônoma (Universidade Federal Rural da Amazônia). Mestre em Agronomia (Universidade Federal de Lavras). Professora da Universidade do Estado do Pará, Brasil.

*Autor para correspondência: ediellengomes@yahoo.com.br

RESUMO. A caracterização de microrganismos é estratégica para a proteção de plantas. Assim, objetivou-se analisar as características morfológicas e avaliar o crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura do fungo *Quambalaria* sp. A caracterização morfológica foi realizada com base na cor, tipo da colônia, tipo e tamanho de esporos, sendo utilizadas chaves taxonômicas e literaturas especializadas para descrição e identificação das estruturas fúngicas. Para a avaliação do crescimento micelial e esporulação foram utilizados os meios de cultivo batata-dextrose-água (BDA), verdura-água (V8-água) e aveia-água (AO). Foram obtidos dois isolados denominados Q1 e Q2 que apresentaram diferentes tipos de colônias e crescimento micelial, sendo os esporos de ambos caracterizados como hialinos, diminutos com formato obovóide a fusiforme e suas hifas septadas. Constatou-se uma relação linear entre a esporulação e o crescimento micelial, ou seja, quanto maior foi a esporulação maior foi o crescimento micelial. O meio de cultura V8-água foi o que mais estimulou o crescimento micelial e esporulação do isolado Q1 e o meio BDA o do isolado Q2, apresentando o IVCM de 11,07 e 10,57 mm.dia⁻¹, respectivamente. Os resultados deste estudo nos permitem embasar o início de um estudo a respeito do gênero *Quambalaria*, na região norte do Brasil e somar aos poucos trabalhos relatados acerca deste patossistema.

Palavras-chave: mancha-foliar, eucalipto, fitopatógeno, patologia florestal.

Isolation, characterization morphological and evaluation of mycelial growth and sporulation of various means culture of *Quambalaria* sp.

ABSTRACT. The characterization of microorganisms is strategic for plant protection. The objective was to analyze the morphological characteristics and the mycelial growth and sporulation on different culture media fungus *Quambalaria* sp. Morphological characterization was based on color, type of colonies, type and size of spores were used taxonomic keys and specialized literature for description and identification of fungal structures. For the assessment of mycelial growth and sporulation were used means potato dextrose agar culture (PDA), vegetable-agar (V8 agar) and oatmeal agar (OA). two isolates were obtained denominated Q1 and Q2 showed that different types of colonies and mycelial growth, and the spores of both characterized as hyaline, miniature format with obovoid the fusiform and its chambered hyphae. A linear relationship between sporulation and mycelial growth was observed, that is, the larger the sporulation, the greater mycelial growth. The means of V8-agar culture was the most stimulated mycelial growth and sporulation isolated Q1 and the BDA through the isolated Q2, with the MIGS of 11.07 and 10.57 mm day⁻¹, respectively. The results of this study allow us to base the start of a study on the *Quambalaria* gender, in northern Brazil and to add to the few reported studies on this pathosystem.

Keywords: leaf spot; eucalyptus; phytopathogen; forest pathology.

1. Introdução

A caracterização de doenças tem grande importância, pois oferece uma referência concreta que auxilia na tomada de decisões e no direcionamento de políticas públicas de defesa fitossanitária. Em países com ações organizadas, há toda uma estrutura voltada para manter essas informações atualizadas, constituindo bancos de dados de ocorrência e distribuição de patógenos para todo o seu território, o que auxilia no diagnóstico e monitoramento de patógenos, possibilitando a tomada de decisões e a adoção de ações coordenadas para mitigar potenciais riscos à agricultura e silvicultura em tempo hábil (SHIVAS et al., 2006; SHARMA et al., 2008).

De acordo com Gunnell e Gubler (1992) alguns dos caracteres morfológicos que podem ser utilizados para fins taxonômicos são características culturais, estudos de conídios e apressórios.

A mancha foliar e anelamento da haste, causada por *Quambalaria* sp., é atualmente uma das principais doenças do eucalipto na fase de viveiro. Devido à sua recente constatação no estado do Amapá, pouco se conhece sobre suas características. Alguns estudos sobre este patossistema já foram realizados na região centro-oeste brasileira por Alfenas et al. (2001); Krugner; Auer, 2005; Zauza et al. (2003); Andrade et al., (2007); Mafia et al., (2009).

Segundo o estudo filogenético de Beer et al. (2006) o gênero *Quambalaria* pertencente à família Quambalariaceae, consiste em fungos fitopatogênicos apenas com sua fase anamórfica conhecida, que causam doença em folhas e rebentos de eucalipto e em seu parente próximo corymbia.

O reconhecimento de *Quambalaria* sp. como um basidiomiceto não tem sido amplamente considerado porque o teleomorfo nunca foi observado, estudos sobre os membros da Microstromatales têm sido limitados, muito provavelmente porque eles não têm sido considerados como um grupo economicamente importante de fungos. Esta percepção está mudando rapidamente com a disseminação de doenças causadas por membros da família Quambalariaceae relatadas em plantações comerciais de eucalipto na África do Sul (WINGFIELD et al., 1993), Brasil e Uruguai (ALFENAS et al., 2001; ZAUZA et al., 2003), e em plantações de Corymbia na Austrália (SIMPSON, 2000; PEGG et al., 2005). O que deve ser considerado como um desafio, uma vez que muitas questões em torno da biologia e da distribuição deste intrigante grupo de fungos permanecem sem resposta (BEER et al., 2006).

Os ciclos de vida e estratégias de infecção de espécies do gênero *Quambalaria* não têm sido amplamente estudados. O fato desses fungos estarem relacionados com os fungos da

subdivisão Ustilaginomycotina, sugere que seu ciclo de vida possa não ser tão simples. A falta de compreensão da biologia desse fungo claramente dificulta o avanço para o controle eficaz das diversas manifestações da doença associada a ele. Neste sentido, estudos sobre a biologia de *Quambalaria* sp. fazem-se urgentemente necessários para fornecer subsídios ao conhecimento e ao controle desse patógeno de importância mundial (ZHOU et al., 2008).

Diante deste contexto, a manutenção de informações sobre microrganismos, isolados de diversas plantas e em diferentes ecossistemas do mundo é essencial para a preservação desta biodiversidade, visando pesquisar novas associações, além de identificar e caracterizar novos grupos taxonômicos que possam apresentar ameaça aos produtos agrícolas e às espécies florestais. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar as características morfológicas e avaliar o crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura do fungo *Quambalaria* sp.

2. Material e Métodos

A coleta de material vegetal doente, com sintomas típicos de *Quambalaria* sp. relatado em literatura (Alfenas et al., 2001) foi realizada no viveiro de plantio comercial da empresa Amapá Florestal e Celulose S. A. (AMCEL) situado no município de Tartarugalzinho, localizado no planalto central do Estado do Amapá no extremo norte do Brasil, sob coordenadas de 01°15'10" N e 50°49'21,867" W. O Clima da região considerado pela classificação de Köppen é do tipo Am, com estação chuvosa de dezembro a julho e estiagem de agosto a novembro, com precipitação anual de 2.700 mm e temperatura média variando de 26 °C a 28 °C (MELÉM JÚNIOR et al., 2003).

Os estudos de caracterização morfológica dos isolados de *Quambalaria* sp. foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia e da Universidade do Estado do Amapá (UEAP), localizada no município de Macapá, capital do Estado do Amapá.

Isolados do fungo *Quambalaria* sp. foram obtidos de amostra de folhas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, oriundas do viveiro de plantio comercial da empresa AMCEL. De cada amostra foram selecionadas aleatoriamente folhas com sintomas típicos da doença, essas foram lavadas com água corrente para a retirada das sujidades superficiais e posteriormente efetuação de corte de fragmentos de tecidos infectados.

Em câmara de fluxo laminar, realizou-se a desinfestação dos fragmentos em álcool 70% por trinta segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 1%, durante um minuto e, posteriormente, imersão em água destilada e esterilizada (ADE).

Uma vez retiradas às sujidades dos fragmentos, os mesmos foram dispostos sobre papel de filtro esterilizado para secagem e, com auxílio de uma pinça previamente flambada, foram transferidos quatro fragmentos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 40,0 ml do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) sintético suplementado com cinco gotas de cloranfenicol com o intuito de evitar contaminação do material. As placas foram mantidas em câmara de crescimento de demanda bioquímica do oxigênio (BOD) em temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Após 48 h os isolamentos foram efetuados com a retirada de discos de micélios das extremidades das colônias de *Quambalaria* sp. crescidas dos fragmentos vegetais com sintomas da doença. Para isto, utilizou-se alça descartável estéril, transferindo-se os discos para novas placas de Petri de 9,0 cm, contendo o meio BDA sintético suplementado com cinco gotas de cloranfenicol. Estes foram incubados por um período de sete dias em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Na individualização dos conídios para a obtenção de culturas monospóricas foi realizada a seguinte metodologia: inicialmente foi obtida uma suspensão concentrada do inóculo, por meio da colônia fúngica crescida em meio BDA. Foram colocados 10 ml de ADE dentro da placa de Petri, para a homogeneização da suspensão com auxílio da alça de Drigalsk esterilizada e para que os esporos se soltassem. Realizando-se em seguida o processo de quatro diluições. Posteriormente, retirou-se com uma pipeta graduada, 1 ml da suspensão menos concentrada de esporos e transferiu-se para placas de Petri de 9,0 cm, contendo meio de cultura ágar-água (AA), suplementado com cinco gotas de cloranfenicol. Após 48 horas de incubação a uma temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, operando sob microscópio óptico em câmara de fluxo laminar, foram selecionados esporos que se encontravam isolados. Os quais, em seguida foram transferidos com uma alça descartável estéril para placas de Petri de 9,0 cm contendo o meio BDA, suplementado com 5 gotas de cloranfenicol, totalizando em 12 repetições para cada isolado.

A partir da obtenção em meio BDA das culturas monospóricas puras houve a caracterização morfológica feita com base na cor, tipo da colônia, Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) calculado de acordo com a fórmula de Oliveira (1992) (Equação 1), preparo de lâminas para medições de estruturas microscópicas (tipo e tamanho do conídio e do conidióforo), fotomicrografias e utilização de chaves taxonômicas como a de Simpsom (2000) e de literaturas especializadas (ALFENAS et al., 2001; ANDRADE et al., 2007; ALFENAS et al., 2009; MYCOBANK, 2015).

$$IVCM = \sum \frac{D - Da}{N} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, em mm.dias⁻¹;

D = diâmetro médio atual da colônia, em mm;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior, em mm; e

N = número de dias.

A velocidade de crescimento foi classificada como:ápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias) (ANDRADE, 2015).

Para avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura foi utilizado como tratamentos os meios: BDA; verdura-ágar (V8-ágar) e aveia-ágar (AO), observou-se qual destes favoreceu o crescimento micelial e esporulação, interferindo desta forma nas atividades morfofisiológicas do fitopatógeno. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado para cada meio de cultivo, constituindo-se de 12 repetições para cada isolado.

Para o crescimento micelial os meios de cultura foram suplementados com cinco gotas de cloranfenicol e distribuídos em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro. Após a solidificação dos meios de cultura, um disco de 1 cm de diâmetro contendo micélio da cultura monospórica de *Quambalaria* sp. com 10 dias de incubação foi transferido para o centro das placas. Em seguida as mesmas foram seladas com papel aderente, identificadas e incubadas em estufa do tipo BOD sob fotoperíodo de 12h à temperatura de 25°C. A avaliação do experimento iniciou 24h após sua instalação, realizando-se medições ortogonais do diâmetro das colônias diariamente, durante sete dias. Cada medição correspondeu à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, mediante o uso de uma régua milimetrada. Foi calculado o IVCm (Equação 1) para cada meio de cultura, visando constatar qual deles mais favoreceu o crescimento dos isolados fúngicos.

Para a esporulação foram utilizadas as colônias com 7 dias de incubação obtidas no processo do crescimento micelial, a avaliação consistiu-se na contagem de esporos (conídios) do fitopatógeno, através de hemacitômetro em microscópio óptico com lente de aumento de 40X.

Os dados da avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultivo, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$) utilizando o software estatístico R.

3. Resultados e Discussão

Os sintomas nas folhas das mudas oriundas do viveiro da empresa AMCEL foram bem visíveis, com formação de manchas necróticas arroxeadas contendo pústulas esbranquiçadas de formatos subcircular a angular as quais cobriam as manchas (Figura 1), assim como abordado no Mycobank (2015) e nos trabalhos de Alfenas et al. (2001) e Alfenas et al. (2009) para o gênero *Quambalaria*.



Figura 1. A- Mancha foliar e esporulação branca na face abaxial em híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*; B- Detalhe de esporulação na face abaxial da folha sob microscópio estereoscópico; e C- Manchas necróticas e esporulação na face abaxial sob microscópio óptico. / **Figure 1.** A- Spot leaf and white sporulation on the abaxial surface in hybrid *E. grandis* x *E. urophylla*; B- sporulation detail in abaxial leaf under a stereoscopic microscope; and C- necrotic spots and sporulation on the abaxial surface under an optical microscope.

Das amostras coletadas das folhas foram isoladas duas culturas monospóricas puras que foram identificadas com base nas características macroscópicas do gênero fúngico e denominadas como: Q1 e Q2. Os isolados apresentaram dois tipos de colônias uma com aspecto farináceo/denso (isolado Q1) e outra com aspecto aveludado/cotonoso (isolado Q2), ambas de coloração esbranquiçada e micélio aéreo. O isolado Q1 apresentou cor alaranjada no verso da colônia, enquanto que em Q2, cor amarelada (Figura 2).

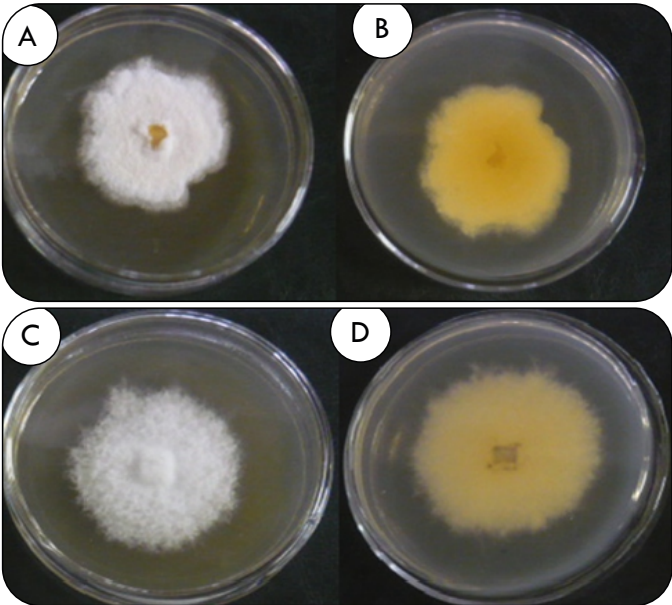


Figura 2. Isolado Q1 (à esquerda): A- Parte aérea da colônia fúngica; e B- Verso da colônia fúngica. Isolado Q2 (à direita): C- Parte aérea da colônia fúngica; e D- Verso da colônia fúngica. / **Figure 2.** Isolated Q1 (left): A- Part aerial fungal colony; and B- Verse fungal colony. Isolated Q2 (right): C Part aerial fungal colony; and D-Verse fungal colony.

As estruturas reprodutivas dos isolados apresentaram-se hialinas fazendo-se necessário o uso do corante azul de metileno para sua visualização. Seus conídios mostraram-se diminutos com formato obovoide a fusiforme com parede lisa, ápice subagudo e base apiculada conídios primários, com dimensões de 9,0-11,0 x 3,5-5,7 μm (isolado Q1), 6,3-10,0 x 2,0-4,5 μm (isolado Q2), enquanto os secundários apresentaram dimensões de 3-5 x 1-2,5 μm (isolado Q1), 2,4-4,8 x 0,9-2,3 μm (isolado Q2). Ambos isolados apresentaram hifas septadas, hialinas, ramificadas (Figura 3).

Segundo Aparecido, Furtado e Figueiredo (2008), as variações no comprimento e largura dos conídios podem ser observadas entre isolados diferentes e, também, no mesmo isolado. Isto pode ocorrer tanto quando se utiliza o mesmo ou diferentes substratos para o crescimento das colônias.

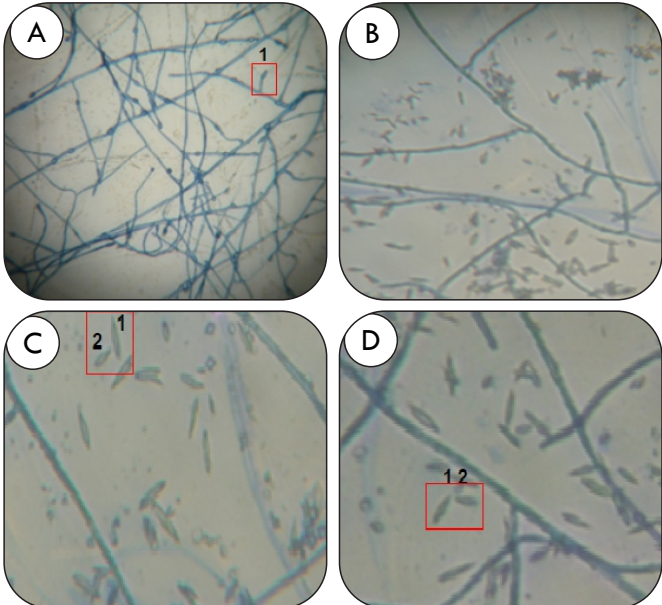


Figura 3. A- Hifas septadas com conídios primários do isolado Q1 (1); B- Hifas septadas e conídios do isolado Q2; C- Isolado Q1 conídios primários (1) e secundários (2); e D- Isolado Q2 conídios primários (1) e secundários (2). / **Figure 3.** A- Hyphae septate conidia with primary isolated Q1 (1); B- hyphae septate and conidia isolated Q2; C- Isolated Q1 primary conidia (1) and secondary (2); and D- Isolated Q2 primary conidia (1) and secondary (2).

Assim, as características microscópicas encontradas nesta pesquisa quando submetidas a comparação no banco de dados do Mycobank (2015) mostraram que o fungo em estudo tratava-se da espécie *Quambalaria eucalypti*. Sendo está pela primeira vez relatada em território amapaense. É válido ressaltar que o registro deste gênero no Brasil se deu em março de 2000 na cidade de Barra do Ribeiro no estado do Rio Grande do Sul, em nota científica Alfenas (2001) constatou ser a ocorrência de uma nova doença em *Eucalyptus* sp., em minijardim clonal.

As cepas fúngicas quando submetidos a avaliação aos diferentes meios de cultura (BDA, V8-água e AO) sofreram alterações no aspecto morfológico de suas colônias (Figura 4).

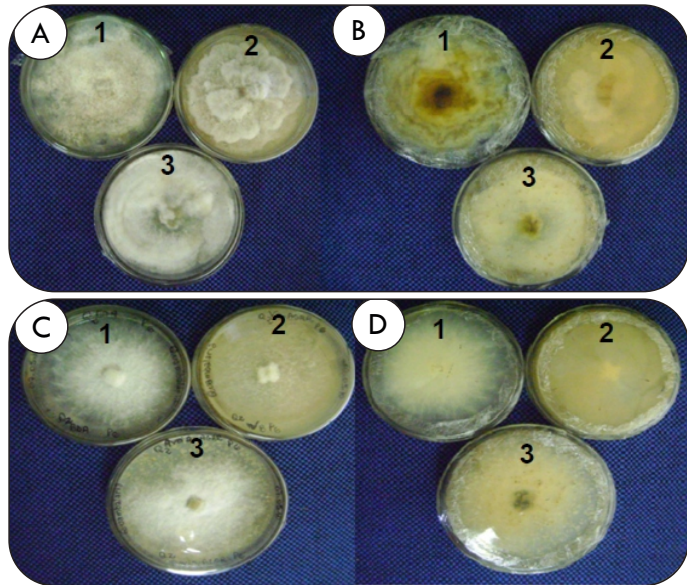


Figura 4. Colônia fúngica dos Isolado Q1 e Q 2 em diferentes meios de cultivo: A/C- Superfície da colônia fúngica; B/D- Verso da colônia; 1- em meio BDA, 2- em meio V8-água, 3- em meio AO. / **Figure 4.** Colony of fungal isolated Q1 and Q2 in different culture media: A/C surface of the fungal colony; B/D colony Verse; 1 on PDA, 2 amid V8-agar, 3 amid OA.

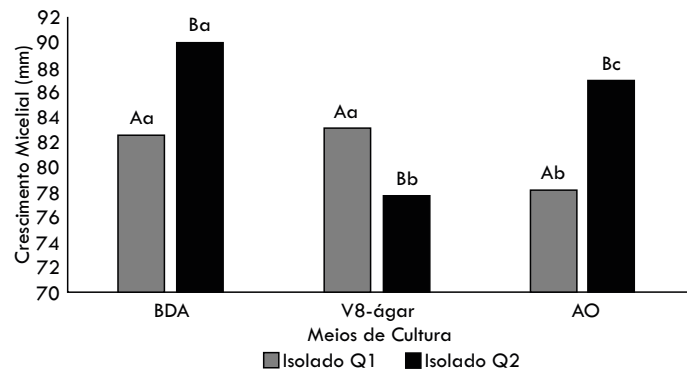


Figura 5. Crescimento micelial dos isolados de *Quambalaria eucalypti*, expresso pelo diâmetro das colônias (mm) aos sete dias de incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ nos meios de cultura batata-dextrose-água (BDA), verdura-água (V8-água) e aveia-água (AO). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística entre os isolados dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos no isolado pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. / **Figure 5.** Mycelial growth of isolated *Quambalaria eucalypti*, expressed by the diameter of the colonies (mm) to seven days incubation at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the media of potato dextrose agar culture (PDA), vegetable-agar (V8 agar) and oatmeal agar (OA). Letters same case indicate that there was no statistical difference between isolates within the same equal treatment and lowercase letters indicate that there was no statistical difference between treatments in isolated by Tukey test at 5% probability.

Os isolados apresentaram uma relação linear entre o crescimento da colônia nos diferentes meios de cultura e o tempo nos sete dias (168 h) de avaliação, obtendo uma velocidade de crescimento classificada como rápida (< 7). O IVCm foi calculado sobre os diâmetros encontrados nas

leituras de 24 a 168 horas, quando o isolado Q2 atingiu crescimento máximo: diâmetro total da placa de Petri (90 mm) com meio BDA. Os cálculos de IVCm (Tabela 1) demonstraram que o isolado Q2 teve a melhor taxa de crescimento em meio BDA ($11,07 \text{ mm.dia}^{-1}$) enquanto que a cepa Q1 em meio V8-água ($10,57 \text{ mm.dia}^{-1}$).

Figura 4. Colônia fúngica dos Isolado Q1 e Q 2 em diferentes meios de cultivo: A/C- Superfície da colônia fúngica; B/D- Verso da colônia; 1- em meio BDA, 2- em meio V8-água, 3- em meio AO. / **Figure 4.** Colony of fungal isolated Q1 and Q2 in different culture media: A/C surface of the fungal colony; B/D colony Verse; 1 on PDA, 2 amid V8-agar, 3 amid OA.

Meios de Cultura	Isolado Q1: Crescimento Micelial (mm)							
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas	IVCM
BDA	8,93	16,78	29,00	50,59	63,37	70,00	82,58	10,52
V8-água	9,12	18,25	39,87	53,54	64,95	71,27	83,08	10,57
AO	7,89	15,50	20,50	37,00	56,00	69,00	78,16	10,04

Meios de Cultura	Isolado Q2: Crescimento Micelial (mm)							
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas	IVCM
BDA	12,53	37,42	50,29	68,29	70,83	84,63	90,00	11,07
V8-água	7,50	13,00	19,50	35,50	54,50	68,00	77,66	10,02
AO	10,97	21,03	40,19	56,81	66,70	75,99	86,91	10,85

A diferença de crescimento observada neste estudo pode ser explicada pela composição nutricional dos diferentes meios utilizados. De acordo com Andrade et al. (2015) isolados fúngicos podem apresentar diferenças significativas na velocidade de crescimento micelial em meios de cultura, isto se deve a composição do meio cultura que pode ou não estimular o crescimento micelial.

Schlöter, Ferraz e Muchovej (2003), reportaram que a atividade microbiana é regulada além das condições nutricionais pela temperatura, disponibilidade de água e outros fatores como concentração de prótons e suprimento de oxigênio.

Quanto à esporulação, a interação entre meios de cultura e isolados foi significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p=223,71$), apresentando um CV= 2,32%. Foi observada uma relação linear entre a esporulação e o crescimento micelial, ou seja, quanto maior foi a esporulação maior foi o crescimento micelial. Assim, os isolados devem ter produzido mais esporos, em até 48 horas de incubação, fator responsável por maior velocidade de crescimento micelial, como explicam Slade et al. (1987).

No entanto, Nozaki et al. (2004) afirmam que nem sempre as condições que favorecem o crescimento são as mesmas para esporulação, meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém mais adequados à produção de esporos.

Para o isolado Q1 não houve diferença estatística para a esporulação entre os meios BDA ($53,00 \text{ esporos mL}^{-1}$) e V8-água ($54,00 \text{ esporos mL}^{-1}$), sendo o meio AO ($47,83 \text{ esporos mL}^{-1}$) o que obteve a menor esporulação. O isolado Q2 obteve diferença de esporulação para os três meios de cultura sendo o meio BDA ($67,16 \text{ esporos mL}^{-1}$) o que mais estimulou o crescimento e V8-água ($47,33 \text{ esporos mL}^{-1}$) o que apresentou menor esporulação (Figura 6).

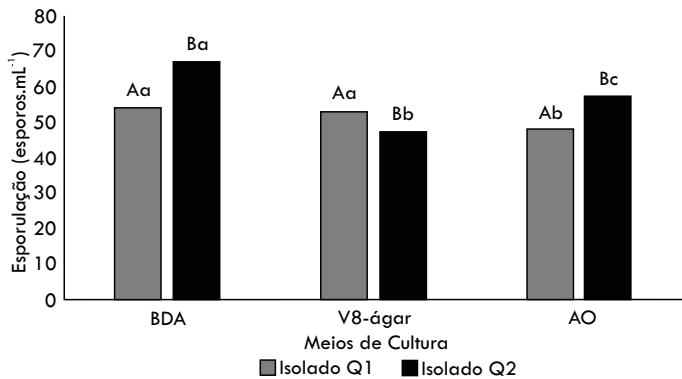


Figura 6. Esporulação dos isolados de *Quambalaria eucalypti*, expresso por esporos mL⁻¹ aos sete dias de incubação a 25 ± 2 °C nos meios de cultura batata-dextrose-água (BDA), verdura-água (V8-água) e aveia-água (AO). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística entre os isolados dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos no isolado pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. / **Figure 6.** Sporulation of isolated *Quambalaria eucalypti*, expressed by esporos mL⁻¹ after seven days of incubation at 25 ± 2 °C on culture medium potato dextrose agar (PDA), vegetable-agar (V8 agar) and oat agar (OA). Letras same case indicate that there was no statistical difference between isolates within the same equal treatment and lowercase letters indicate that there was no statistical difference between treatments in isolated by Tukey test at 5% probability.

Estes resultados diferem em partes do encontrado por Andrade et al. (2007) que ao trabalhar com os meios de cultura BDA, V8-água, CVA, CHA e AA verificou que não houve significância na esporulação de isolados do fungo do gênero *Quambalaria*, no entanto os mesmos autores mencionam que o meio BDA é o mais favorável à produção de esporos do patógeno.

Sendo assim, quando um fungo cresce bem em um substrato e não em outro, acredita-se que metabólitos específicos estejam envolvidos (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997). A esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual, estão envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (CASTRO; COELHO, 2000).

4. Conclusões

Os isolados fúngicos apresentaram diferentes tipos de colônias, no entanto os conídios de ambos foram caracterizados como hialinos, diminutos, com formato obovóide a fusiforme.

Conclui-se com base na análise dos caracteres morfológicos que os fungos estudados pertencem a espécie *Quambalaria eucalypti*.

O meio de cultura V8-água foi o que mais estimulou o crescimento micelial do isolado Q1 e o meio BDA o do isolado Q2. Foi observada uma relação linear entre a esporulação e o crescimento micelial, ou seja, quanto maior foi a esporulação maior foi o crescimento micelial.

Pra o isolado Q1 V8-água (54,00 esporos.mL⁻¹) foi o meio de cultura que mais estimulou a esporulação e para o isolado Q2 foi o meio BDA (67,16 esporos.mL⁻¹).

Desta forma, os resultados deste trabalho permitem embasar novos estudos e ampliar os conhecimentos acerca da existência e diversidade de fungos dentro gênero *Quambalaria* na região norte do Brasil, fitopatógeno de importância para a cultura de eucalipto na fase de viveiro ou mini-jardim clonal.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a UEAP pela infraestrutura disponibilizada, a empresa Amapá Florestal e Celulose S. A. pelo fornecimento da matéria-prima para a realização do estudo, ao CNPq pela concessão de bolsa de Incentivo a Pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A.; ROSA, O. P.; ASSIS, T. F. *Sporothrix eucalypti* um novo patógeno de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 26, n. 2, p. 221-221, 2001.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.Á.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças em eucalipto**. Viçosa: UFV, 2009. 502 p.

ANDRADE, G. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; ZAUZA, E. A.; COUTO, M. M.; MAFFIA, L. A. Características culturais e severidade da mancha foliar de *Quambalaria eucalypti* sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. **Fitopatologia. Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 329-334, 2007.

ANDRADE, M. V. R. F. D.; DEUSDARÁ, T. T.; SCHEIDT, G. N.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella* sp. de solo do Sul do Tocantins, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 2, p. 58-64, 2015.

APARECIDO, C. C.; FURTADO, E. L.; FIGUEIREDO, M. B. Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 38-47, 2008.

BEER, Z. W.; BEGEROW, D.; BAUER, R.; PEGG, G. S.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the *Quambalaria* fam. nov., including important *Eucalyptus* pathogens in South Africa and Australia. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 289-298, 2006.

CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 4, p. 466-471, 2000.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 2, p. 503-7, 2003.

GUNNELL, P. S.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, v. 84, n. 2, p. 157-165, 1992.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças do eucalipto. In: Kimati, H., Amorin, L., Rezende, J. A. M., BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 319-332.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ANDRADE, G. C.; VANETTI, C. A.; BINOTI, D. H. Effects of leaf position, surface, and entry sites on *Quambalaria eucalypti* infection in eucalypt. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 3-9, 2009.

MENEZES, M., SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106p.

MELÉM JÚNIOR, N. J.; FARIAS NETO, J. T.; YOKOMIZO, G. K. I. **Caracterização dos cerrados do Amapá**. Macapá: Embrapa Amapá, 2003. 5 p. (Embrapa Amapá. Comunicado técnico, 105).

MYCOBANK. **Fungal databases, nomenclatures and species bank**. 2015. Disponível em: http://w ww.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank &MycoBankNr_=28451. Acesso: 01 nov. 2015.

MUELLER, D. S.; BUCK, J. W. Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust. **Plant Disease**, v. 87, n. 4, p. 442-445, 2003.

NOZAKI, M. D. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de culturas, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 429-432, 2004.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 1992.

PEGG, G. S.; DRENTH, A.; WINGFIELD, M. J. *Quambalaria pitereka* on spotted gum plantations in Queensland and northern New South Wales, Australia. In: **XII IUFRO World Congress**, p. 8: 13. 2005.

SIMPSON, J. A. *Quambalaria*, a new genus of eucalypt pathogens. **Australasian Mycologist**, v. 19, n. 2, p. 57-62, 2000.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1, p. 255-262, 2003.

SHARMA, S. B.; YOU, M.; VARAPRASAD, K. S. Biosecurity-An Integral Part of Global Food Security Strategy. **Indian Journal of Plant Protection**, v.2, p. 165-172, 2008.

SHIVAS, R. G.; BEASLEY, D. R.; PASCOE, I. G.; CUNNINGTON, J. H.; PITKETHLEY, R. N.; PRIEST, M. J. Specimen-based databases of Australian plant pathogens: past, present and future. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 2, p. 195-198, 2006.

SLADE, S. J.; HARRIS, R. F.; SMITH, C. S.; ANDREWS, J. H. Microcycle conidiation and spore-carrying capacity of *Colletotrichum gloeosporioides* on solid media. **Applied and environmental microbiology**, v.53, n.9, p. 2106-2110, 1987.

WINGFIELD, M. J.; CROUS, P. W.; SWART, W. J. *Sporothrix eucalypti* (sp. nov.), a shoot and leaf pathogen of *Eucalyptus* in South Africa. **Mycopathologia**, v. 123, n. 3, p. 159-164, 1993.

ZAUZA E. A. V., ALFENAS A. C., LANGRELL S. R. H., TOMMERUP, I. C. Detection and identification of *Quambalaria* species in *Eucalyptus* nurseries and plantations. In: **Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch, New Zealand. p. 113, 2003.